草地螟滞育幼虫的蛋白和核酸含量变化

张健华[1,2]，罗礼智[1,*]，江幸福[1]，张 蕾[1]

（1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
2. 华中农业大学植物科技学院，武汉 430070）

摘要：为了阐明草地螟 *Loxostege sticticalis* 滞育的分子调控基础，本研究应用 Trizol 法、DNA 和蛋白质定量试剂盒、SDS-PAGE 电泳技术分别对进入滞育 1，2，3 和 4 个月、解除滞育以及非滞育草地螟老熟幼虫中的核酸含量、总蛋白含量和组分的变化进行了测定。结果表明：滞育不同月份幼虫的总 RNA 含量显著低于非滞育幼虫的总 RNA 含量($P<0.05$)；解除滞育幼虫的总 RNA 含量显著高于滞育 2，3 和 4 个月的幼虫，但仍显著低于非滞育的对照组。滞育不同月份、非滞育以及解除滞育幼虫的总 DNA 含量没有显著差异($P>0.05$)。RNA/DNA 比值随滞育的开始而显著下降，随着滞育的结束而显著上升。滞育不同月份的幼虫总蛋白含量显著高于非滞育幼虫的总蛋白含量($P<0.05$)，但解除滞育与非滞育幼虫的总蛋白含量无显著差异。利用 SDS-PAGE 电泳分析发现滞育幼虫体内存在滞育关联蛋白，蛋白条带在 24 kDa 左右，但非滞育和已经解除滞育的幼虫则没有该蛋白条带。这些结果表明，总 RNA 含量的降低、RNA/DNA 比值下降、总蛋白含量的升高，以及 24 kDa 蛋白的存在是草地螟幼虫滞育的主要生理特征。

关键字：草地螟；滞育；核酸含量；蛋白质含量；RNA/DNA 比值

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2012)02-0156-06

Changes in protein and nucleic acid contents in diapause larvae of the beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae)

ZHANG Jian-Hua[1,2], LUO Li-Zhi[1,*], JIANG Xing-Fu[1], ZHANG Lei[1] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To understand the molecular regulation of diapause in the beet webworm, *Loxostege sticticalis* L., we analyzed the contents and compositions of proteins and nucleic acids in non-diapause larvae, diapausing larvae with the diapause duration of 1, 2, 3, and 4 months, and post-diapause larvae of this species by using Trizol method, DNA and protein quantitative kit, and SDS-PAGE technique. The results showed that the RNA content in the diapausing larvae with the diapause duration of 1 to 4 months was significantly lower than that of the non-diapause larvae. Although RNA content in the post-diapause larvae increased significantly as compared with that of the diapausing larvae with the diapause duration of 2, 3 and 4 months, it was significantly lower than that of the non-diapause larvae. The DNA content among these treatments was not significantly different, but the RNA/DNA ratio in the diapausing larvae with the diapause duration of 1 to 4 months was lower than that in the non-diapause and post-diapause larvae. The protein content in all the diapause larvae was significantly higher than that in the non-diapause larvae, but there was no significant difference between the non-diapause and the post-diapause larvae. A protein band of 24 kDa was found in the diapausing larvae with the diapause duration of 1 to 4 months but was not detected in the non-diapause and post diapause larvae by using the SDS-PAGE technique. These results suggest that the lower RNA content, the lower RNA/DNA ratio, and higher protein content, as well as the presence of 24 kDa-protein, are the major characteristics of the diapause larvae distinguishing from the non-diapause and post-diapause larvae of *L. sticticalis*.

Key words: *Loxostege sticticalis*; diapause; nucleic acid content; protein content; RNA/DNA ratio

基金项目：国家自然科学基金项目(31071641)；国家行业科技项目(201003079)

作者简介：张健华，女，1985 年生，吉林长春人，硕士研究生，研究方向为农业昆虫与害虫综合治理，E-mail：zhangjianhua85128@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lzluo@ippcaas.cn

收稿日期 Received：2011-10-17；接受日期 Accepted：2012-01-16

昆虫在滞育期间代谢速率会比较低，形态上变化不明显，这一表面看来似乎静止的状态有其复杂的生理学及生物化学基础。滞育昆虫体内的水分、糖、脂肪、蛋白质、氨基酸、脂肪、酶及核酸等生化物质的含量和种类有所不同，并可能伴随滞育关联特异物质的产生(Danks，1987；王满困和李周直，2004)，它们对滞育的维持和终止起着重要的作用。一些研究对昆虫滞育期间的核酸变化进行了分析，如关雪辰和陈娥英(1982)对七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* 的研究表明，成虫预滞育期 RNA/DNA 为 3.16，滞育期降为 1.24，滞育结束后上升为 7.04。故脂肪体中 RNA/DNA 的降低可认为是滞育发生的信号，而增加则可作为滞育结束的象征。薛瑞德和陆宝麟(1991)报道，短光照可以降低三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* 发育期间的核酸合成作用，10～15 日龄滞育蚊体内的 DNA 含量比发育蚊低，解除滞育的蚊体内 RNA 与 DNA 含量比发育蚊高，新羽化蚊、发育蚊、滞育蚊与非滞育蚊体内 DNA、RNA 含量不同。还有研究表明，在某些滞育昆虫的体内发现存在一种或几种新的蛋白质，认为与昆虫滞育的发生有关，称为滞育关联蛋白(diapause-associated proteins，DAPs)，而在非滞育昆虫中无此蛋白或含量极低(Salama and Miller，1992)。目前已在马铃薯叶甲 *Leptinotarsa decemlineata*、南方玉米秆草螟 *Diatraea crambidoides* 等多种滞育昆虫体内发现了滞育关联蛋白(王满困和李周直，2004)。

草地螟 *Loxostege sticticalis* L. 是我国华北、东北和西北地区农牧业生产的重要害虫(罗礼智和李光博，1993；罗礼智等，1998，2009)，也是一种以老熟幼虫为越冬方式的害虫(田绍义和高世金，1986；陈瑞鹿等，1987；黄少虹等，2009)。通过滞育，草地螟可以度过严寒的冬天(最低可超 -41℃)，并使其种群的持续繁衍成为可能。因此，了解草地螟滞育的行为及生理适应机制对于认识草地螟的越冬规律具有十分重要的意义。但目前国内外关于草地螟滞育的研究主要集中在环境因子如光周期、温度、寄主植物和种群密度等对滞育的诱导作用(Khomyakova *et al*.，1986；黄少虹等，2009)，滞育幼虫与非滞育幼虫的抗寒能力差异(李朝绪等，2006)，滞育期间脂肪(李朝绪等，2006)的变化，保幼激素(JH)滴度的变异(Jiang *et al*.，2011)，滞育打破的环境特征(Jiang *et al*.，2011)以及滞育后成虫迁飞与生殖能力的变化等(Jiang *et al*.，2010)。但是，草地螟滞育期间核酸及蛋白质含量的变化，以及是否存在着滞育关联蛋白目前还未见报道。为了进一步阐明草地螟滞育的生理特征及滞育调控的分子基础，并为草地螟发生动态的准确预测和科学防治提供科学依据，本研究在认真总结已有研究工作的同时，结合本实验室已有的工作基础，对非滞育，滞育 1－4 月、以及打破滞育的草地螟老熟幼虫体内蛋白质、核酸含量的变化，以及滞育关联蛋白的存在与否等进行了探究。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

虫源来自河北省康保县(114°63′E，41°87′N)采集的幼虫，在实验开始之前已在本实验室内(温度为21±1℃，相对湿度为 70%～80%，光周期16L∶8D的条件下饲养)连续繁殖一年。

非滞育幼虫的获取：非滞育草地螟幼虫在温度为21±1℃，相对湿度为70%～80%，光周期16L∶8D 的条件下饲养，幼虫以灰菜 *Chenopodium album* L. 为饲料，密度为 10 头/850 mL 玻璃瓶，每天更换饲料直至幼虫成熟停止取食。取这些停止取食的老熟幼虫作为非滞育幼虫的处理。

滞育幼虫的获取：滞育幼虫在光周期为12L∶12D 的条件下饲养，温湿条件与非滞育幼虫的饲养条件相同。幼虫入土作茧后，待其羽化。当出现羽化成虫 1 周后，对草地螟进行去土剥茧。为避免剥茧操作对正常发育幼虫化蛹的影响，可将没有羽化的虫茧从柔软的一端剥开，如果发现仍为预蛹虫态，则初步判定为滞育个体。然后将这些个体再重新放入瓶内，一周后仍为预蛹虫态则确定为滞育个体。将确定为滞育的个体转入光周期为 12L∶12D，温度为 8℃的气候箱分别放置 1，2，3 和 4 个月后剖开茧取出虫体作为滞育不同时长的处理。

解除滞育幼虫的获取：将已经滞育 5 个月的草地螟幼虫转入非滞育条件(光周期为 16L∶8D，温度为21℃)下放置 1～2 周后，发现瓶中已有部分幼虫开始变成蛹，把那些未化蛹仍为幼虫虫态的草地螟视为解除滞育幼虫。

1.2　RNA 和 DNA 含量的测定

RNA 含量的测定采用 Trizol 法提取，主要的操作步骤为：将同一时间幼虫 20 头置于 1.5 mL 离心管中，加入液氮研磨再加入 1 mL 的裂解液 Trizol；冰上放置 5 min 后加入 200 μL 的氯仿，剧烈摇晃震

荡，置于冰上2～3 min使其分层，12 000 r/min 4℃离心15 min；吸取上层水相加入500 μL异丙醇，混匀，－20℃静置60 min让RNA沉淀。12 000 r/min 4℃离心10 min，倒去上清液，加入75%的乙醇1 mL洗涤RNA，7 500 r/min 4℃离心3 min，倒去上清吸干残余液体，空气中干燥3 min，用DEPC水溶解RNA。然后取RNA溶液于酶标仪测 A_{260} 和 A_{280} 值，选 A_{260}/A_{280} 比值在1.8～2.0之间样品做统计分析。

DNA含量的测定采用Promega试剂盒提取，将同一时间幼虫20头置于1.5 mL离心管中，加入液氮研磨然后加入600 μL Nuclei Lysis solution，65℃水浴加热2 h；然后加入3 μL RNase solution混合后37℃水浴加热15～30 min，冰上放置5 min；再加入200 μL的蛋白质沉淀剂，剧烈震荡20 s，在冰上放置5 min，15 000 r/min离心4 min；吸取上清液到一个干净的离心管中，加入600 μL的异丙醇，轻轻混合直到形成白色可见的DNA，然后15 000 r/min离心1 min，DNA将形成可见白色小球，轻轻倒出上清液，加入70%的乙醇600 μL，轻轻倒转几次洗涤DNA，然后15 000 r/min离心1 min，弃去上清液，室温中干燥15 min，再加入100 μL的DNA Rehydration solution 65℃水浴加热1 h，最后取DNA溶液于酶标仪测 A_{260} 和 A_{280} 值，选 A_{260}/A_{280} 比值在1.6～1.8之间样品做统计分析。

RNA/DNA比值的确定：RNA/DNA = RNA平均值(μg/mg)/DNA平均值(μg/mg)

1.3　蛋白质含量的测定

取同一时间的幼虫20头于预冷的玻璃匀浆器中，加入适当体积的组织蛋白提取剂并匀浆处理，冰浴20 min，10 000 r/min离心20 min，置于－20℃备用。蛋白质含量的测定采用天根BCA蛋白定量试剂盒测定，取适当的待测样品加入96孔板中，每孔加入200 μL BCA工作液，并充分混匀，37℃孵育30 min后冷却至室温，用酶标仪在562 nm下测定吸光度，标准曲线用牛血清蛋白制作。

1.4　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用Bio-Rad型电泳仪和BG-vermini型电泳槽进行SDS-PAGE电泳。根据各样品蛋白质浓度，吸取等量蛋白质置于EP管中，加入与蛋白质提取液1/4体积的SDS-PAGE样品处理液，沸水中煮5 min后开始电泳。分离胶浓度为12%，浓缩胶浓度为5%，浓缩胶和分离胶分别以80 V和120 V电压进行电泳。当溴酚兰到达距离凝胶底部约5 mm时停止电泳。取下凝胶，考马斯亮蓝染色、脱色，凝胶成像分析系统分析并拍照。

1.5　数据统计与分析

所得数据用平均值±标准误（*SE*）来表示，应用统计分析软件为SPSS 16.0，用Turkey氏多重比较进行差异显著性测定。

2　结果与分析

2.1　不同处理的草地螟幼虫的RNA，DNA以及RNA/DNA的比较

RNA含量测定结果(图1)表明，草地螟进入滞育后1～4个月的幼虫总RNA含量显著低于非滞育幼虫($P<0.05$)，非滞育幼虫RNA含量为滞育不同时间的幼虫的1.8～2.7倍，而滞育各组之间没有显著差异。表明非滞育幼虫体内的物质代谢活跃，而滞育期间物质合成代谢水平较低。而一旦草地螟幼虫解除滞育后其RNA含量上升，但是仍然显著低于非滞育的对照组。

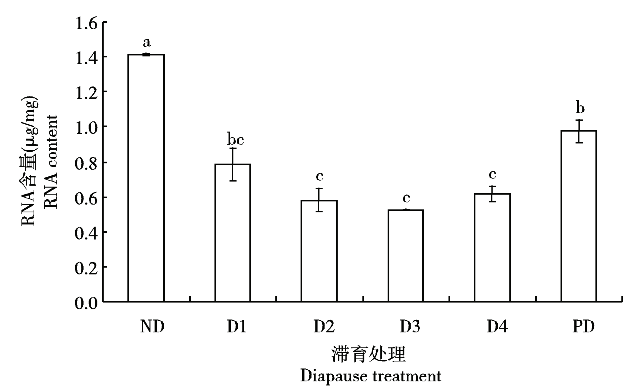


图1　不同处理的草地螟幼虫RNA含量变化

Fig. 1　Variation in RNA content in *Loxostege sticticalis* larvae subjected to different treatments

ND：非滞育 Non-diapause；D1：滞育1个月 Diapause duration of 1 month；D2：滞育2个月 Diapause duration of 2 months；D3：滞育3个月 Diapause duration of 3 months；D4：滞育4个月 Diapause duration of 4 months；PD：解除滞育 Post-diapause. 图中数据为平均数±标准误，柱上具有不同字母者表示Turkey氏多重比较差异显著(0.05水平)，每个数据为3次重复的平均值，每次重复的幼虫数为20头；下图同。Data are presented as the mean ± *SE*. Bars sharing different letters indicate significant difference at the 5% level by Turkey's test. The data for each treatment is the average of 3 duplications, and each duplication consists of samples of 20 larvae. The same for the following figures.

结果(图2)表明，非滞育、滞育不同时期以及解除滞育的草地螟幼虫DNA含量存在一定的差异，含量最低的为滞育3个月的幼虫(0.727 μg/mg)，

含量最高的为非滞育幼虫(1.3501 μg/mg)，但这些差异并没有达到显著水平($P>0.05$)，表明 DNA 在滞育、非滞育以及解除滞育的幼虫体内含量比较稳定。

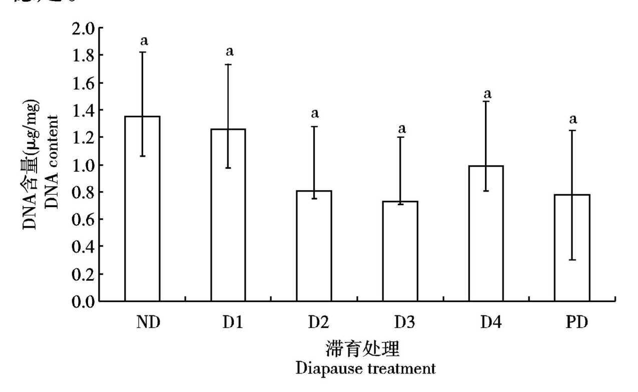


图 2　不同处理的草地螟幼虫 DNA 含量变化

Fig. 2　Variation in DNA content in *Loxostege sticticalis* larvae subjected to different treatments

由图 3 发现，RNA/DNA 值的变化与 RNA 含量的变化相似，也呈现出“下降-上升”的过程，即滞育期间的 RNA/DNA 值较低，非滞育和解除滞育的 RNA/DNA 比值明显较高。

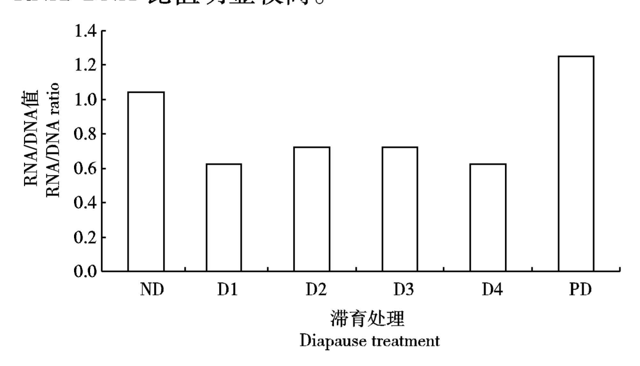


图 3　不同处理的草地螟幼虫 RNA/DNA 比值的变化

Fig. 3　The variation in RNA/DNA ratio in *Loxostege sticticalis* larvae subjected to different treatments

2.2　不同处理的草地螟幼虫的蛋白质含量的比较

图 4 表明，草地螟进入滞育后不同时间的各组总蛋白含量均显著高于非滞育幼虫($P<0.05$)，而滞育各组之间没有显著差异。随着滞育的解除总蛋白含量下降到与非滞育幼虫相似水平。

2.3　不同处理的草地螟幼虫中蛋白质的 SDS-PAGE 电泳图谱分析

SDS-PAGE 电泳图谱分析结果(图 5)表明，蛋白在非滞育和滞育期的表达存在明显差异，而在滞育期的不同阶段几乎完全一致。24 kDa 左右的蛋白在滞育不同时期的幼虫体内表达量很高，而在非滞育和滞育解除后的幼虫体内含量极低或几乎没有。

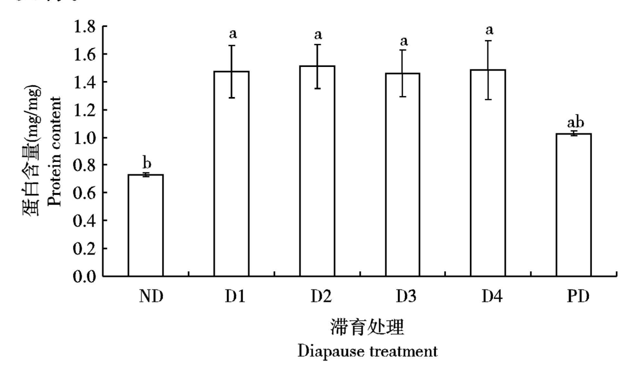


图 4　不同处理的草地螟幼虫蛋白含量变化

Fig. 4　Variation in protein content in *Loxostege sticticalis* larvae subjected to different treatments

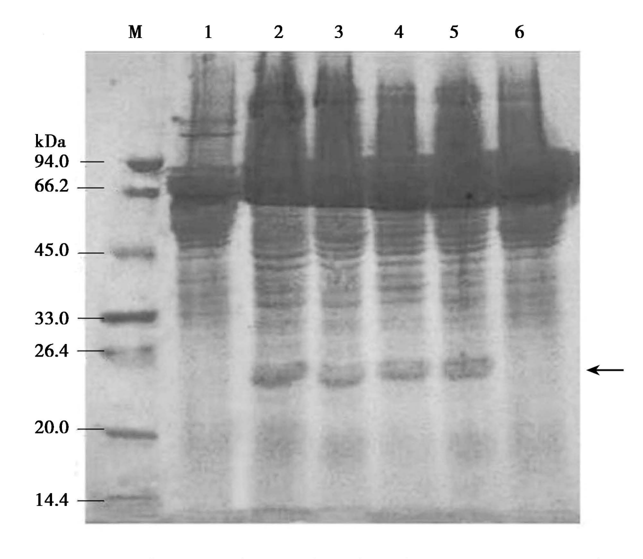


图 5　不同处理的草地螟幼虫中蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 5　SDS-PAGE analysis on proteins in *Loxostege sticticalis* larvae subjected to different treatments

M：蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight marker.

3　讨论

本研究所得的结果表明，草地螟滞育幼虫、非滞育幼虫、以及滞育结束后的幼虫在 RNA 含量、RNA/DNA 的比值、蛋白质含量以及滞育关联蛋白等存在着显著的差异；但在滞育不同月份的滞育幼虫中，这些指标的变化不明显。

核酸是生物细胞内储存及传递信息的生物大分子，也是虫体的基本组成物质，在昆虫胚胎发育、胚后生长、发育、变态、繁殖及遗传和变异等生命活动过程中起着极为重要的作用(刘惠霞等，1998)。有关昆虫滞育与核酸含量变化的关系，前

人已有报道。如麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana*，美凤蝶 *Papilio memnon*，枯叶蛱蝶 *Kallima inachus*，家蝇 *Musca domestica* 等滞育期间 RNA 含量较低(仵均祥等，2003；易传辉等，2009a，2009b；刘流等，2009)，而柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* 滞育蛹 RNA 含量较高(易传辉等，2009c)，家蚕 *Bombyx mori* 卵滞育代谢的显著特点之一就是在滞育末期核糖体 RNA 大量合成(Kubota *et al*.，1979)。Ring(1973)对丝光绿蝇 *Lucilia sericata* 进行研究的结果表明，滞育幼虫 RNA/DNA 往往在狭小范围内变动，这一比值低且稳定，经过滞育阶段后，RNA/DNA 比值增大，并认为这是滞育结束的可靠指标。我们的研究结果表明，处于滞育期间的草地螟幼虫 RNA 含量较低，DNA 含量比较稳定，滞育期间的 RNA/DNA 明显降低，这一结论与前人已有的研究结果基本一致，因此也可以把 RNA/DNA 比值的降低和升高作为草地螟幼虫滞育开始及结束的信号之一。

草地螟不同时期幼虫蛋白质含量存在显著差异，滞育期间蛋白含量较高，非滞育虫体内蛋白含量相对较低，这与 Salama 和 Miller(1992)对棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 的研究结果基本一致，说明蛋白质作为昆虫体内的结构成分和生物功能大分子，其含量与昆虫滞育的发生和终止密切相关。但这与王方海等(1998)20℃下饲养的滞育棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 蛹，Lee 和 Denlinger(1996)对舞毒蛾 *Lymantria dispar* 预 1 龄幼虫以及成卫宁等(2008)对麦红吸浆虫 *S. mosellana* 的研究结果存在一定差异，他们的结果表明，滞育期间蛋白含量较低说明滞育期间体内储存的部分蛋白质可能转化为其他物质，以增强自身的防护能力从而安全度过滞育阶段；滞育解除后蛋白质含量升高说明幼虫恢复发育后，需要较多的蛋白质以满足正常的发育。

昆虫体内的蛋白表达与滞育密切相关。SDS-PAGE 电泳发现，24 kDa 蛋白在滞育幼虫体内表达量很高，而非滞育的幼虫虫体内则不存在该蛋白(图5)。这与棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 滞育幼虫中的 490 kDa 蛋白(Salama and Miller，1992)；西南玉米杆草螟 *Diatraea grandiosella* 滞育幼虫中的 41 kDa 蛋白(Brown and Chippendale，1978)，棉铃象甲 *Anthonomus grandis* 血淋巴中的 77 kDa 蛋白(Lewis *et al*.，2002)和舞毒蛾 *L. dispar* 预 1 龄幼虫中的 30，35，55 和 60 kDa 蛋白(Lee and Denlinger，1996)的表达特点相一致。该蛋白的特异性的高量表达，极有可能是导致滞育幼虫总蛋白含量显著高于非滞育幼虫的直接原因，而这种蛋白也极有可能就是保证草地螟幼虫能够成功度过低温时期的关键蛋白之一或唯一蛋白种类。虽然没能进一步验证该特异蛋白就是草地螟滞育的相关蛋白，但是这个发现为将来揭开草地螟滞育机制奠定了基础。

参考文献(References)

Brown JJ, Chippendale GM, 1978. Juvenile hormone and a protein associated with the larval diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *Insect Biochemistry*, 8(5): 359 – 367.

Chen RL, Wang SY, Bao XZ, Sun YJ, 1987. Study on diapause of webworm, *Loxostege sticticalis*: effect of photoperiod and temperature on development and diapause. *Acta Phytophylacica Sinica*, 14(4): 253 – 258. [陈瑞鹿，王素云，暴祥致，孙雅杰，1987. 草地螟滞育的研究：光照周期、温度与发育及滞育的关系. 植物保护学报，14(4)：253 – 258]

Cheng WN, Li YP, Li JJ, Li XL, Wu JX, Wang HL, 2008. Protein contents and electrophoresis patterns of the pre-diapause, diapause and post-diapanse larvae in the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* Gehin. *Acta Phytophylacica Sinica*, 35(2): 155 – 159. [成卫宁，李怡萍，李建军，李修炼，仵均祥，王洪亮，2008. 小麦吸浆虫滞育前后和滞育期蛋白质含量及其电泳分析. 植物保护学报，35(2)：155 – 159]

Danks HV, 1987. Insect Dormancy: An Ecological Perspective. Biological Survey of Canada, Ottawa, Canada.

Guan XC, Chen EY, 1982. The relation between nucleic acid metabolism in the fat body and reproductive diapause in *Coccinella septempunctata* L. *Acta Entomologica Sinica*, 25(3): 239 – 243. [关雪辰，陈娥英，1982. 七星瓢虫成虫脂肪体核酸代谢与生殖滞育的关系. 昆虫学报，25(3)：239 – 243]

Huang SH, Jiang XF, Luo LZ, 2009. Effects of photoperiod and temperature on diapause induction in the beet webworm *Loxostege sticticalis* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(3): 274 – 280. [黄少虹，江幸福，罗礼智，2009. 光周期和温度对草地螟滞育诱导的影响. 昆虫学报，52(3)：274 – 280]

Jiang XF, Huang SH, Luo LZ, 2011. Juvenile hormone changes associated with diapause induction, maintenance, and termination in the beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 77(3): 134 – 144.

Jiang XF, Huang SH, Luo LZ, Liu YQ, Zhang L, 2010. Diapause termination, post-diapause development and reproduction in the beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Physiology*, 56(9): 1325 – 1331

Khomyakova VO, Bykova EP, Uzikhina VS, 1986. Effect of food and photoperiodic conditions on development of beet webworm, *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Entomological Review*, 65(4): 90 – 96.

Kubota I, Isobe M, Imai K, 1979. Characterization of the silkworm diapause hormone B. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(6): 1075 – 1078.

Lee KY, Denlinger DL, 1996. Diapause-regulated proteins in the gut of pharate first instar larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, and the effect of KK-42 and neck ligation on expression. *Journal of Insect Physiology*, 42(5): 423 – 431.

Lewis DK, Spurgeon D, Sappington TW, Keeley LL, 2002. A hexamerin protein, AgSP-1, is associated with diapause in the boll weevil. *Journal of Insect Physiology*, 48(9): 887 – 901.

Li CX, Luo LZ, Pan XL, 2006. Cold-hardiness in the diapause and non-diapause larvae of meadow moth, *Loxostege sticticalis* L. *Plant Protection*, 32(2): 41 – 44. ［李朝绪，罗礼智，潘贤丽，2006. 草地螟滞育和非滞育幼虫抗寒能力的研究. 植物保护，32(2): 41 – 44］

Liu HX, Li XG, Wu WJ, 1998. Insect Biochemistry. Shaanxi Science and Technology Press, Xi'an. 65 – 87. ［刘惠霞，李新岗，吴文君，1998. 昆虫生物化学. 西安：陕西科学技术出版社. 65 – 87］

Liu L, He LF, Liu H, Yan R, Wan QH, 2009. The impact of diapause on the protein and nucleic acid of *Musca domestica* larva. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 20(2): 119 – 121. ［刘流，贺莉芳，刘晖，晏容，万启惠，2009. 滞育对家蝇蛋白和核酸的影响. 中国媒介生物学及控制杂志，20(2): 119 – 121］

Luo LZ, Huang SZ, Jiang XF, Zhang L, 2009. Characteristics and causes for the outbreaks of beet webworm, *Loxostege sticticalis* in northern China during 2008. *Plant Protection*, 35(1): 27 – 33. ［罗礼智，黄绍哲，江幸福，张蕾，2009. 我国2008年草地螟大发生特征及成因分析. 植物保护，35(1): 27 – 33］

Luo LZ, Li GB, 1993. The threshold temperature, thermal constant and division of generation regions of meadow moth (*Loxostege sticticalis* L.) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 36(3): 332 – 339. ［罗礼智，李光博，1993. 草地螟的有效积温及其世代区的划分. 昆虫学报，36(3): 332 – 339］

Luo LZ, Zhang HJ, Kang AG, 1998. Causes for outbreak of the meadow moth, *Loxostege sticticalis* in the Zhangjiakou region of Hebei province during 1997 production season. *Journal of Natural Disasters*, 7(3): 158 – 164. ［罗礼智，张红杰，康爱国，1998. 1997年张家口市一代草地螟幼虫大发生原因分析. 自然灾害学报，7(3): 158 – 164］

Ring RA, 1973. Changes in dry weight, protein and nucleic acid contents during diapause and normal development of the blowfly, *Lucilia sericata*. *J. Insect Physiol.* 19(3): 481 – 493.

Salama MS, Miller TA, 1992. A diapause associated protein of the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* Saunders. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 21(1): 1 – 11.

Tian SY, Gao SJ, 1986. Studies on diapause of beet webworm. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 1(2): 105 – 110. ［田绍义，高世金，1986. 草地螟滞育特性的研究. 华北农学报，1(2): 105 – 110］

Wang FH, Gong H, Qin JD, 1998. Measurement and electrophoresis patterns of hemolymph protein from diapause and non-diapause destined *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica*, 41(4): 426 – 430. ［王方海，龚和，钦俊德，1998. 滞育和非滞育棉铃虫血淋巴中蛋白质含量及图谱的比较. 昆虫学报，41(4): 426 – 430］

Wang MQ, Li ZZ, 2004. The research advance of insect diapause. *Journal of Nanjing Forestry University*, 28(1): 71 – 76. ［王满囷，李周直，2004. 昆虫滞育的研究进展. 南京林业大学学报，28(1): 71 – 76］

Wu JX, Yuan F, Li YP, 2003. Studies on both larval status and nucleic acid contents of the wheat midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin). *Journal of Northwest A&F University*, 31(6): 49 – 56. ［仵均祥，袁锋，李怡萍，2003. 麦红吸浆虫幼虫滞育状态及其核酸含量变化研究. 西北农林科技大学学报，31(6): 49 – 56］

Xue RD, Lu BL, 1991. Effects of photoperiod regime on nucleic acid kinetics during development of *Culex tritaeniorhynchus* Giles. *Acta Entomologica Sinica*, 34(2): 173 – 177. ［薛瑞德，陆宝麟，1991. 光周期对三带喙库蚊发育期间体内核酸动态的影响. 昆虫学报，34(2): 173 – 177］

Yi CH, Chen XM, Shi JY, Zhou CL, 2009a. Comparison of nucleic acid contents among non-diapause pupae, diapause pupae and eclosion-adult from diapause pupae of *Papilio memnon*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 37(11): 5018 – 5019. ［易传辉，陈晓鸣，史军义，周成理，2009a. 美凤蝶非滞育蛹、滞育蛹与滞育蛹羽化成虫核酸含量的比较. 安徽农业科学，37(11): 5018 – 5019］

Yi CH, Chen XM, Shi JY, Zhou CL, 2009b. Comparison of nucleic acid contents between non-diapause adult and over-winter adult of *Kallima inachus*. *Guangdong Agricultural Sciences*, 37(5): 165 – 167. ［易传辉，陈晓鸣，史军义，周成理，2009b. 枯叶蛱蝶非滞育成虫与越冬成虫核酸含量的比较. 广东农业科学，37(5): 165 – 167］

Yi CH, Chen XM, Shi JY, Zhou CL, 2009c. Comparison of nucleic acid contents among non-diapause pupae, diapause pupae and eclosion-adult from diapause pupae of *Papilio xuthus*. *Hubei Agricultural Sciences*, 48(5): 1160 – 1162. ［易传辉，陈晓鸣，史军义，周成理，2009c. 柑橘凤蝶非滞育蛹、滞育蛹与滞育蛹羽化成虫核酸含量比较. 湖北农业科学，48(5): 1160 – 1162］

（责任编辑：赵利辉）